

# JP6070796A

## Publication Title:

PRETREATING AGENT, PRETREATING METHOD, MEASUREMENT BY PRETREATED SPECIMEN, KIT FOR MEASUREMENT AND DIAGNOSIS OF INFECTIOUS DISEASE

## Abstract:

### Abstract of JP 6070796

(A) Translate this text PURPOSE:To provide a method for quickly determining beta-glucan and endotoxin in a specimen originated from blood in high detection ratio. CONSTITUTION:The present invention relates to (1) a pretreatment agent containing a hexadimethrine compound and an alkali metal hydroxide, (2) a pretreatment agent 1 containing nonionic surfactant and an alkaline earth metal halide as additional components, (3) a pretreatment agent 1 containing alkali metal halide as an additional component, (4) a pretreatment agent composed mainly of an alkali metal hydroxide, (5) a pretreating method characterized by the mixing of a specimen with a pretreatment agent of 1-4 and the heating of the mixture, (6) a determination method for a substance specifically reacting with Limulus reagent in the specimen taking advantage of Limulus reaction by pretreating the specimen by the method 5., mixing the treated specimen with a Limulus reagent and detecting the variation of the substrate, (7) a determination kit composed of (A) the above pretreatment agent and (B) a Limulus reagent and (8) a diagnostic procedure to determine a substance by the above determination method and judging the affection with infectious disease when the amount of the substance exceeds a prescribed level.

---

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-70796

(43)公開日 平成6年(1994)3月15日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 Q 1/37		6807-4B		
1/04		6807-4B		
G 01 N 33/531	B	8310-2J		
33/579		9015-2J		

審査請求 未請求 請求項の数17(全 20 頁)

(21)出願番号	特願平5-100426	(71)出願人	000195524 生化学工業株式会社 東京都中央区日本橋本町2丁目1番5号
(22)出願日	平成5年(1993)4月2日	(72)発明者	田中 重賀 東京都小平市小川西町五丁目3番15号
(31)優先権主張番号	特願平4-142010	(72)発明者	田村 弘志 東京都武蔵村山市中藤四丁目6番の13
(32)優先日	平4(1992)5月8日	(74)代理人	弁理士 萩野 平 (外3名)
(33)優先権主張国	日本 (JP)		

(54)【発明の名称】 前処理剤、前処理方法、前処理された試料による測定法、測定用キット及び感染症の診断方法

(57)【要約】 (修正有)

【目的】 血液由来試料中のβ-グルカン及びエンドトキシンの高検出率・迅速測定法の提供。

【構成】 ヘキサジメトリン化合物およびアルカリ金属水酸化物を含む前処理剤、の前処理剤であって、更に非イオン性界面活性剤およびアルカリ土類金属ハロゲン化物を含む前処理剤、の前処理剤であって、更にアルカリ金属ハロゲン化物を含む前処理剤、アルカリ金属水酸化物を主成分とする前処理剤、～に記載された前処理剤と試料を混合し、加温することを特徴とする前処理方法、リムルス反応を利用して試料中のリムルス試薬に特異的に反応する物質を測定する方法であって、試料をの方法で前処理し、処理後の試料をリムルス試薬と混合して反応させ、基質の変化を検出する測定法、(A)前記前処理剤、(B)リムルス試薬からなる測定用キット、前記測定法で物質を定量し、該物質が一定量を超えたときに感染症に罹患したと判定する診断方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 生化学反応に対する反応妨害因子を含む試料の前処理剤であって、ヘキサジメトリン化合物およびアルカリ金属水酸化物を含むことを特徴とする前処理剤。

【請求項2】 生化学反応に対する反応妨害因子を含む試料がリムルス反応に対する反応妨害因子を含む試料である請求項1の前処理剤。

【請求項3】 リムルス反応を利用して試料中のエンドトキシンを測定する際に使用的する請求項1の前処理剤であって、更に非イオン性界面活性剤もしくは陰イオン性界面活性剤およびアルカリ土類金属ハロゲン化物を含む前処理剤。

【請求項4】 リムルス反応を利用して試料中の(1→3)- $\beta$ -D-グルカンを測定する際に使用する請求項1の前処理剤であって、更にアルカリ金属ハロゲン化物を含む前処理剤。

【請求項5】 リムルス反応を利用して試料中の(1→3)- $\beta$ -D-グルカンを測定する際に、リムルス反応に対する反応妨害因子を含む試料をリムルス反応に先立って処理するために使用する前処理剤であって、アルカリ金属水酸化物を主成分とする前処理剤。

【請求項6】 複数の溶液として保存され、使用時に該溶液が混ざることを特徴とする請求項1～5のいずれか1項に記載の前処理剤。

【請求項7】 リムルス反応に対する反応妨害因子を含む試料中に含まれるリムルス反応によって検出できる物質を、該反応を利用して検出する際に、リムルス反応に先立って試料を処理するための前処理方法において、請求項1～6のいずれか1項に記載された前処理剤と試料を混合し、加温することを特徴とする前処理方法。

【請求項8】 試料が血液由來の試料である請求項7記載の前処理方法。

【請求項9】 リムルス反応によって検出できる物質がエンドトキシンであり、前処理剤が請求項3記載の前処理剤である請求項7記載の前処理方法。

【請求項10】 リムルス反応によって検出できる物質が(1→3)- $\beta$ -D-グルカンであり、前処理剤が請求項4または5に記載の前処理剤である請求項7記載の前処理方法。

【請求項11】 リムルス反応を利用して試料中のリムルス試薬に特異的に反応する物質を測定する方法であつて、試料を請求項7～10のいずれか1項の方法で前処理し、処理後の試料をリムルス試薬と混合して反応させ、基質の変化を検出することを特徴とする測定法。

【請求項12】 少なくとも下記の構成試薬からなることを特徴とするリムルス試薬に特異的に反応する物質を測定するための測定用キット。

(A) 請求項1～6の前処理剤からなる群から選択され

る1種以上の前処理剤。

(B) カブトガニ・アメボサイト・ライセートを原料として得られたリムルス試薬。

【請求項13】 (B) のリムルス試薬が、エンドトキシンに特異的に反応するリムルス試薬であり、リムルス試薬に特異的に反応する物質がエンドトキシンである請求項12記載の測定用キット。

【請求項14】 (B) のリムルス試薬が、(1→3)- $\beta$ -D-グルカンに特異的に反応するリムルス試薬であり、リムルス試薬に特異的に反応する物質が(1→3)- $\beta$ -D-グルカンである請求項12記載の測定用キット。

【請求項15】 構成試薬として、さらに下記(C)を含むことを特徴とする請求項13記載の測定用キット。

(C) エンドトキシンの一定量を含む標準試薬。

【請求項16】 構成試薬として、さらに下記(D)を含むことを特徴とする請求項14記載の測定用キット。

(D) (1→3)- $\beta$ -D-グルカンの一定量を含む標準試薬。

【請求項17】 生体由來の試料中のリムルス試薬に特異的に反応する物質を請求項11の測定法で定量し、該物質の測定値が一定量を超えたときに感染症に罹患した生体に由来する試料であると判定することを特徴とする感染症の診断方法。

【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、生化学反応に対する反応妨害因子を含む試料の前処理剤、その前処理方法、前処理された試料による測定法、その測定法に使用される測定用キット、および試料からの感染症の診断方法に関するものである。特に、カブトガニ・アメボサイト・ライセートを用いたリムルス反応による測定において、その反応を妨害する因子を含む生体由來試料、特に血液由來試料中の(1→3)- $\beta$ -D-グルカンおよびエンドトキシンの測定法に関するものであり、殊に真菌感染症およびグラム陰性菌感染症患者の血液由來試料中のそれぞれ(1→3)- $\beta$ -D-グルカンおよびエンドトキシンを高い精度で測定して真菌感染症およびグラム陰性菌感染症を診断するために有効な上記血液由來試料の処理および前記測定法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】 従来から、生化学反応を利用した生体試料中の目的物質の測定が、臨床診断と関わりながら広く行われている。例えば、典型的な生化学的診断として、リムルス反応を利用した真菌あるいはグラム陰性菌の検出が挙げられる。リムルス反応は、リムルス試薬を用いる生化学反応である。

【0003】 リムルス試薬に含まれるカブトガニ・アメボサイト・ライセート(以下、単に「ライセート」といふこともある)には、エンドトキシンと反応して活性化

されるカスケードタイプの凝固系(C因子系)と(1→3)- $\beta$ -D-グルカン(以下「 $\beta$ -グルカン」ということもある)と反応して活性化されるカスケードタイプの凝固系(G因子系)とが共存しており(図1)、前者の系のみを利用してエンドトキシンを特異的に測定する方法、後者の系のみを利用して $\beta$ -グルカンを特異的に測定する方法がそれぞれ知られている(Obayashi T. et al., Clin. Chim. Acta, 149, 55-65 (1985))。また、真菌感染症の患者は血液中の $\beta$ -グルカンが増加し、グラム陰性菌感染症の患者は血液中のエンドトキシンが増加する。血液中の $\beta$ -グルカンまたはエンドトキシンを測定することによってそれぞれ真菌感染症またはグラム陰性菌感染症を診断できることも知られている。

【0004】このようなG因子系を利用する $\beta$ -グルカンおよびC因子系を利用するエンドトキシンの測定法は、検出感度が非常に高いため生体試料中の上記各物質の微量検出に適しており、特に深在性真菌感染症およびグラム陰性菌感染症の診断への有効性が検討確認され、臨床検査に使用され始めている。ところで、生体試料、特に血液中の $\beta$ -グルカンおよびエンドトキシンをそれぞれライセトのG因子系およびC因子系によるカスケード反応を利用して測定する場合には、該反応がライセト中のセリンプロテアーゼの反応を利用するため、その中に含まれる種々の反応妨害因子(例えば、トロンビンや $\alpha_2$ 因子はライセト中の凝固酵素と類似の作用を示すため、偽陽性因子となり、 $\alpha_2$ -プラスミンヒビター、 $\alpha_1$ -アンチトリプシンおよびアンチトロンビンIIIは反応を強力に阻害し、偽陽性因子となる)を失活あるいは除去するための前処理が必要である。この目的のために従来は、血液試料に特定の処理を施して多血小板血漿(FRP)を調製し、さらに過塩素酸を加えて37°Cで加温処理した後、変性析出物を遠心分離して除去し、その後溶液を採取し、アルカリで中和して被検液とする方法が採用されていた(Obayashi T. et al., Clin. Chim. Acta, 149, 55-65 (1985))が、変性析出物の分離操作が煩雑で全操作工程も多く、操作中に反応系に影響を与える物質による汚染の危険性があるなどの問題があった。

【0005】ところで、エンドトキシンや $\beta$ -グルカンを測定するための上記のような前処理法は、すべて試験管中で前処理を行い、しかも、このように前処理された試料の一部を他の試験管に取り出してリムルス反応を行うことにより実施されていた。さらに、測定を合成基質法で行う際には、リムルス反応後、基質が開裂して生成したp-ニトロアリニンをジア化反応によって赤色色素に変換して吸光度を測定するというエンドポイント法が一般的に使用されていた。エンドポイント法は、通常、操作が煩雑で測定時間も長い方法であり、多数の検体を短時間で一度に処理できる方法が望まれている。試

験管の代わりにマイクロプレートを使用すれば、多数の検体を同時に扱うことができるが、エンドポイント法では連続的な自動測定は困難である。

【0006】そこで、このようなマイクロプレートを使用でき、かつ基質の変化を直接自動測定できるカイネティック法(特開平3-220456)による測定が望まれているが、マイクロプレートの反応液量は少なく、反応液の漏り等の影響により精度よく測定できないという問題があった。また、エンドトキシンと $\beta$ -グルカンは使用する反応系が異なるために試料の前処理も異なり、これらを同一試料について測定しようとすると各々異なる方法による前処理が必要であるから、非常に労力が必要であると共に不経済であり、1回の処理で両者の測定に利用可能な前処理剤が望まれていた。

【0007】そして、生体試料を一種の前処理剤で前処理し、種々の生化学反応に適用できる汎用性のある前処理剤があれば、測定法、生体試料でそれぞれ異なる煩雑な前処理を行う必要がなく、生化学的研究、診断等に寄与する効果は非常に大きいことが期待できるため、このような前処理剤が望まれていた。

#### 【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記の従来の前処理法の問題点を解決しようとするもので、生化学反応に対する反応妨害因子、例えば、リムルス反応におけるG因子系またはC因子系反応に対する反応妨害因子を含む血液由来試料中の該反応因子を簡単な処理で除去又は変性し、変性析出物の分離操作を必要としない方法で、かつ生化学反応による測定時に漏りが生じない方法を採用することによって血液由来試料中の $\beta$ -グルカンまたはエンドトキシンを極めて高い検出率で、迅速に効率よく測定できる前処理剤、前処理方法、測定方法、測定用キット、及び感染症の診断方法を提供するものである。

#### 【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は、生化学反応に対する反応妨害因子を含む試料の前処理剤であって、ヘキサジメトリン化合物およびアルカリ金属水酸化物を含むことを特徴とする前処理剤(以下「汎用前処理剤」ともいう)である。本発明の前処理剤は、特にリムルス反応に対する反応妨害因子を含む試料に好適に使用される。

【0010】本発明は、リムルス反応を利用して試料中のエンドトキシンを測定する際に使用する、前記ヘキサジメトリン化合物およびアルカリ金属水酸化物を含む前処理剤であって、更に非イオン性界面活性剤もしくは陰イオン性界面活性剤およびアルカリ土類金属ハログン化物を含む前処理剤(エンドトキシン測定用前処理剤)を提供する。

【0011】本発明は、リムルス反応を利用して試料中の(1→3)- $\beta$ -D-グルカンを測定する際に使用す

る、前記ヘキサジメトリン化合物およびアルカリ金属水酸化物を含む前処理剤であって、更にアルカリ金属ハロゲン化物を含む前処理剤(β-グルカン測定用前処理剤A)を提供する。本発明は、リムルス反応を利用して試料中の(1→3)-β-D-グルカンを測定する際に、リムルス反応に対する反応妨害因子を含む試料をリムルス反応に先立って処理するために使用する前処理剤であって、アルカリ金属水酸化物を主成分とすることを特徴とする前処理剤(β-グルカン測定用前処理剤B)を提供する。

【0012】本発明の上記種々の前処理剤は、複数の溶液として保存され、使用時に該溶液が混合される構成でもよい。特に、予め混合しておくと漏りが生じたり、分解するような成分同士は分離して別々の溶液に存在させて保存することが好ましい。本発明は、リムルス反応に対する反応妨害因子を含む試料中に含まれるリムルス反応によって検出できる物質を、該反応を利用して検出する際に、リムルス反応に先立って試料を処理するための前処理方法において、前記前処理剤の群から選択される特定の前処理剤と試料を混合し、加温することを特徴とする前処理方法を提供する。尚、測定目的物質が同じ場合等は、場所によりこれら前処理剤は、組み合わせて混合して使用し得る場合がある。

【0013】この前処理方法は、試料が血液由來の試料である場合に好適に用いられる。本発明は、リムルス反応によって検出できる物質がエンドトキシンであり、前処理剤がエンドトキシン測定用前処理剤である前記前処理方法、およびリムルス反応によって検出できる物質が(1→3)-β-D-グルカンであり、前処理剤がβ-グルカン測定用前処理剤AまたはBである前記前処理方法を提供する。

【0014】本発明は、リムルス反応を利用して試料中のリムルス試薬に特異的に反応する物質を測定する方法であって、試料を前記前処理法のいずれかの方法で前処理し、処理後の試料をリムルス試薬と混合して反応させ、基質の変化を検出することを特徴とする測定法を提供する。本発明は、少なくとも下記の構成試薬からなることを特徴とするリムルス試薬に特異的に反応する物質を測定するための測定キットを提供する。

(A) 前記前処理剤からなる群から選択される1種以上の前処理剤。

(B) カブトガニ・アメバサイト・ライセートを原料として得られたリムルス試薬。

【0015】ここで、エンドトキシンを特異的に測定するためには、(B)のリムルス試薬は、エンドトキシンに特異的に反応する試薬であり、リムルス試薬に特異的に反応する物質がエンドトキシンであることが好ましい。構成試薬として、さらに(C)エンドトキシンの一定量を含む標準試薬を含むことが好ましい。また、β-グルカンを特異的に測定するためには、(B)のリムル

ス試薬は、β-グルカンに特異的に反応する試薬であり、リムルス試薬に特異的に反応する物質がβ-グルカンであることが好ましい。構成試薬として、さらに(D)β-D-グルカンの一定量を含む標準試薬を含むことが好ましい。

【0016】そして、本発明は、生体由來の試料中のリムルス試薬に特異的に反応する物質を前記基質の変化を検出する測定法で定量し、該物質の濃度値が一定量を超えたときに感染症に罹患した生体に由來する試料であると判定することを特徴とする感染症の診断方法を提供する。以下本発明を具体的に説明する。

【0017】本発明の前処理剤において対象とする「生化学反応に対する反応妨害因子を含む試料」とは、生化学反応により測定される目的物質を含む可能性のある試料であって、反応妨害因子の一種以上を生化学反応に影響を及ぼす程度に含むものである。該試料は典型的には、生体由來試料であり、特に血液由來試料である。血液由來試料としては、典型的にはトを含む哺乳動物から採取された血液を公知の方法で処理して得られた血漿又は血清そのもの、あるいはプロテアーゼ類、プロテアーゼインヒビター類、血液由來の蛋白質等を含む血漿又は血清等である。ここで、「反応妨害因子」とは所定の生化学反応とは無関係に反応する因子(偽陽性因子)又はいずれかの段階における反応に阻害的に作用する因子(偽陰性因子)で、典型的には血液中に含まれる前記因子等である。

【0018】血液から血漿を調製するためには通常、血液にヘパリン等の血液凝固阻止剤を添加し、遠心分離して血球を沈殿させればよい。その際、遠心分離を低回転数(例えは、150×g程度)で行うと、血小板を多く含んだ多血小板血漿(PPR)が得られ、高回転数(例えは、1,000×g程度)で行うと、貧血小板血漿(PP)が得られる。本発明で測定対象とする血液由來試料が血漿である場合、PPR又はPPのいずれかであってよい。

【0019】また血清は、血液から血球といくつかの血液凝固因子を取り除いたものであり、通常採取した血液を容器中に放置し、生成した血餅を分離除去することによって調製される。上記血液由來試料等を、本発明の前処理剤で処理することによって反応妨害因子によるリムルス反応等の生化学反応への影響が除去される。

【0020】「生化学反応」としては、リムルス反応、抗原抗体反応、酵素反応等一般的に生物物質の測定に使用される反応が例示される。本発明において「リムルス反応」とは、カブトガニのアメバサイト(血球細胞)を低張液等で抽出したライセート(カブトガニ・アメバサイト・ライセート)のC因子系成分(少なくともC因子とB因子と凝固酵素前駆体を含む成分)とエンドトキシンとの反応およびG因子系成分(少なくともG因子と凝固酵素前駆体を含む成分)とβ-グルカンとの反応の一

方または両方を包含する意味で使用する。「リムルス試薬」および「カブトガニ・アメボサイト・ライセートを原料として得られたリムルス試薬」は、いずれも上記リムルス反応によってエンドトキシンまたは $\beta$ -グルカンを測定するための試薬を意味し、リムルス・ボリフェムス、タキフレウス・トリデンタツス、タキフレウス・ギガス、カルシノスコルピウス・ロツンディカウダ等のカブトガニの血リンバ液から、公知の方法（例えば、J. B. Iochum, 80, 1011-1012 (1976) 参照）で調製した通常のカブトガニ・アメボサイト・ライセートを含有し、必要に応じて後述のペプチド基質を添加した試薬である。「エンドトキシンに特異的に反応するリムルス試薬」とは、上記ライセートのG因子を特異的に阻害または吸着、除去すること（例えば、WO90/02951、U.S.P. 5,155,032、U.S.P. 5,179,006、WO92/03736、WO92/06381、特願平5-61464、またはC因子系成分を分画、再構成すること（例えば、特公平2-18080、特公平3-18080、Obayashi T. et al., Clin. Chim. Acta, 149, 55-65 (1985)）により調製される。また、 $\beta$ -グルカンに特異的に反応するリムルス試薬とは、上記ライセートのC因子を特異的に阻害または吸着、除去すること（例えば、WO91/19981、WO92/16651）、またはG因子系成分を分画、再構成すること（Obayashi T. et al., Clin. Chim. Acta, 149, 55-65 (1985)）により調製される。従って、 $\beta$ -グルカン用リムルス試薬は、エンドトキシンでは活性化されず $\beta$ -グルカンによって特異的に反応系が活性化されるように調製したものである。また、エンドトキシン用リムルス試薬は、 $\beta$ -グルカンで活性化されエンドトキシンによって特異的に反応系が活性化されるように調製したものである。

【0021】本発明において利用し得るリムルス試薬は前記のような機能を有するものであればよく、製法、組成等には限界はない。該リムルス反応においては、 $\beta$ -グルカンまたはエンドトキシンを測定しようとする場合の反応妨害因子としては、G因子系またはC因子系反応に影響を及ぼす因子が挙げられる。ここで、「反応妨害因子」は、 $\beta$ -グルカンまたはエンドトキシンによって開始される、図1に示したライセートのG因子系および/またはC因子系の段階的酵素反応（カスケード反応）のいずれかの段階において $\beta$ -グルカンまたはエンドトキシンとは無関係に反応する前記偽陽性因子又は偽陰性因子である。

【0022】以下、本発明の前処理剤について具体的に述べる。本発明の汎用前処理剤は、少なくともヘキサジメトリン化合物とアルカリ金属水酸化物からなる。このアルカリ金属水酸化物は、カリウム、ナトリウム等のアルカリ金属の水酸化物であり、具体的には水酸化カリウム（KOH）、水酸化リチウム（LiOH）、水酸化ナ

トリウム（NaOH）等である。該前処理剤としては通常單独又は複数のアルカリ金属水酸化物を含む水溶液が使用される。

【0023】前処理剤中のアルカリ金属水酸化物の濃度は、通常、被検液中の該アルカリ金属水酸化物濃度が0.04～0.4モル/1となるように調整することが好ましい。本発明に使用されるヘキサジメトリン化合物は、好ましくは、ヘキサジメトリンの塩、例えば、ヘキサジメトリンハロゲン化物が挙げられる。ヘキサジメトリンハロゲン化物としては、ヘキサジメトリンプロマイド（一般名；ボリブレン）、ヘキサジメトリンクロライド等が好ましいものとして例示されるが、本発明においては、これらハロゲン化物等に限定されるものでなく、所望によりヘキサジメトリンの水素原子を他の置換基、例えば、アルキル基などで置換されたヘキサジメトリン誘導体の塩をも含むものである。

【0024】本発明に使用されるヘキサジメトリン化合物の分子量は、約1,000～50,000、好ましくは5,000～10,000の範囲から選択され、前処理剤中、0.05～0.3%、好ましくは0.1～0.2%（重量/容量）の範囲で使用される。そして、その使用量は、試料が適用される生化学反応に応じて適宜調整される。

【0025】この汎用前処理剤は、その他の任意の化学物質を適宜含有することができ、後述するリムルス反応に適用される前処理剤の組成成分として使用されるものも使用することができる。前記汎用前処理剤は、例えば、リムルス反応に適用される場合は、エンドトキシン測定用、 $\beta$ -グルカン測定用、あるいはこれら両者兼用の測定用として用いることができ、適宜その種類に応じてヘキサジメトリン化合物の量、その他成分の量を微調整することが可能である。

【0026】即ち、本発明は、エンドトキシンおよび $\beta$ -グルカンの両者兼用の測定用前処理剤（以下、兼用前処理剤ともいう）として、少なくとも前記アルカリ金属水酸化物およびヘキサジメトリン化合物を含む前処理剤を提供することができる。アルカリ金属水酸化物は、主として反応妨害因子を変性させる等の機能を有していると考えられ、ヘキサジメトリン化合物は、測定試料の濁度を低減せしめる作用、換言すれば中性脂肪、リボ蛋白に起因すると考えられる非特異的な濁りの増大を抑制する作用を有し、かつ両者の反応系を妨害しない性質を兼ね備えている。両物質を含有する兼用前処理剤は、この一つの前処理剤による検体の処理で各々の反応系での測定が可能なものである。

【0027】本発明の兼用前処理剤は、該2成分の他に所定の成分を追加することにより、更に測定精度を向上させることができる。例えば、そのような成分としては、アミノあるいはイミノ化合物、ビシン〔化学名：N, N-ビス（2-ヒドロキシエチル）グリシン；グッ

ドの緩衝剤の一一種)等が挙げられる。アミノあるいはイミノ化合物としては、アミノ酸、イミノ酸、ポリアミノ酸、ポリエチレンイミン、アミノ基を有する核酸塩基またはこれらの塩が挙げられる。具体的には、ヒスタミン二塩酸塩、L-ヒスチジン二塩酸塩、ボリーレーヒスチジン塩酸塩(分子量15,000~50,000)、ボリーレーリジン塩酸塩(分子量2,000~70,000)、ボリーレーアルギニン塩酸塩(分子量5,000~15,000)、ボリエチレンイミン(分子量1,000~70,000)、アデニン塩酸塩、シトシン塩酸塩等が例示される。

【0028】これらアミノあるいはイミノ化合物は、前処理剤中に0.03~0.3% (重量/容量)の範囲で含まれるように使用される。また、ビシンは、前処理剤中に0.005~0.05モル/1、好ましくは0.02~0.05モル/1の範囲で含まれるように使用される。また、本発明の兼用前処理剤は、エンドトキシン測定用の専用前処理剤および/または $\beta$ -グルカン測定用の専用前処理剤を調製するための中間試薬として利用することもできる。

【0029】エンドトキシン測定用前処理剤は、組成成分として前記兼用前処理剤の組成成分に非イオン性界面活性剤もしくは陰イオン性界面活性剤、およびアルカリ土類金属ハロゲン化物を少なくとも追加した構成である。ここで、非イオン性界面活性剤としては、特に制限はないが、ボリオキシエチレンエーテル類、ボリオキシエチレンソルビタンアルキルエステル類およびn-アルキルグルコビラノンド類等が挙げられる。

【0030】ボリオキシエチレンエーテル類としては、ボリオキシエチレン- $p$ -ターシャリーオクチル(又はイソオクチル)フェニルエーテル(重合度8~40)、ボリオキシエチレン-4-ターシャリーオクチル(又はイソオクチル)シクロヘキシルエーテル(重合度8~40)、ボリオキシエチレン- $p$ -ノルフレニルエーテル(重合度9~15)、ボリオキシエチレンヘプタメチルヘキシルエーテル(重合度10~20)、ボリオキシエチレンドデシルエーテル(重合度10~29)等が挙げられ、市販品としてはトリトン系(Triton series)界面活性剤、ブリジ系(Brij series)界面活性剤等が含まれる。

【0031】n-アルキルグルコビラノンド類としては、n-ヘプチル( $\alpha$ -又は $\beta$ )-D-グルコビラノンド、n-オクチル( $\alpha$ -又は $\beta$ )-D-グルコビラノンド、n-ノニル( $\alpha$ -又は $\beta$ )-D-グルコビラノンド、n-デシル( $\alpha$ -又は $\beta$ )-D-グルコビラノンド、又はn-ドデシル( $\alpha$ -又は $\beta$ )-D-グルコビラノンド等が挙げられる。

【0032】ボリオキシエチレンソルビタンアルキルエステル類としては、ボリオキシエチレンソルビタン(重合度約20)のモノラウレート、モノハルミテート、モ

ノステアレート、モノオレエート又はトリオレエート等が挙げられ、市販品としてはトウイーン系(Tween series)界面活性剤が含まれる。トリトン系界面活性剤としては、トリトン(Triton)X-100、X-114、X-102、X-165、X-305、X-405、ノニデット(Nonidet)P-40等が例示される。ブリジ系界面活性剤としては、ブリジ(Brij)35、58、エマルゲン(Emulgen)120等が例示される。トウイーン系界面活性剤としてはトウイーン(Tween)20、40、60、80、85が例示される。

【0033】陰イオン界面活性剤としては、ドテシル硫酸塩等のアルキル硫酸塩、アルキルベニズルホルム酸塩が挙げられる。ドテシル硫酸塩としては、具体的にはドテシル硫酸ナトリウム、ドテシル硫酸リチウム、ドテシル硫酸カルシウム等を例示できる。アルカリ土類金属ハロゲン化物としては、塩化カリウム、塩化マグネシウム、塩化ストロンチウム等が挙げられる。

【0034】このエンドトキシン測定用前処理剤におけるヘキサジメトリン化合物およびアルカリ金属水酸化物の配合割合は、前記兼用前処理剤とほぼ同じ範囲で調整でき、界面活性剤は、前処理剤中に0.4~0.4% (重量/容量)の範囲で使用され、アルカリ土類金属ハロゲン化物は、前処理剤中に0.005~0.05モル/1の範囲で使用される。

【0035】また、本発明のエンドトキシン測定用前処理剤は、組成成分として、さらに所量の成分を追加することができ、例えば、前記したアミノまたはイミノ化合物、ビシン等を前記兼用前処理剤と同じ程度の範囲で使用することもできる。本発明の $\beta$ -グルカン測定用前処理剤Aは、組成成分として前記兼用前処理剤の組成成分にアルカリ金属ハロゲン化物を少なくとも追加した構成である。

【0036】ここで、アルカリ金属ハロゲン化物としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化リチウム等が例示される。このアルカリ金属ハロゲン化物は、 $\beta$ -グルカンの血液成分への吸着抑制作用を有するものと考えられる。本発明の $\beta$ -グルカン測定用前処理剤Aにおけるヘキサジメトリン化合物およびアルカリ金属水酸化物の配合割合は、前記兼用前処理剤とほぼ同じ範囲で調整でき、アルカリ金属ハロゲン化物は、前処理剤中に0.05~0.5モル/1の範囲で使用される。

【0037】また、本発明の $\beta$ -グルカン測定用前処理剤Aは、組成成分として、さらに所量の成分を追加することができ、例えば、前記したアミノまたはイミノ化合物、ビシン等を前記兼用前処理剤と同じ程度の範囲で使用することもできる。また、本発明は、前記アルカリ金属水酸化物を主成分とする $\beta$ -グルカン測定用前処理剤Bをも提供する。この前処理剤Bには必要に応じて他の添加物が添加されていてもよい。このような添加物としては、例えば、 $\beta$ -グルカンが血液成分に吸着されてG

因子系カスケード反応を抑制するのを防いだり、反応系を安定化したり、再現性を高める作用を有する物質が挙げられる。例えば、アルカリ金属ハログン化物等が好適に例示される。

【0038】上記前処理剤を用いた試料の処理は、基本的には試料に添加混合し、加温することにより行うことができる。そして、所望により攪拌、あるいは振動等を与えるながら加温することもできる。この際の処理温度は、前処理後に適用される生化学反応、あるいは試料の種類により適宜、選定され、通常、25～70°C、特に37～56°Cの範囲が好ましく、処理時間は5～40分、特に5～20分の範囲が好ましい。

【0039】リムルス反応を利用して試料中のリムルス試薬に特異的に反応する物質、即ち、エンドトキシンまたは $\beta$ -グルカンを測定する方法は、本発明の前処理剤で処理された試料をカブトガニ・アメバサイト・ライセートから得られたリムルス試薬と混合して反応させ、基質の変化を検出することにより行うことができる。この場合、エンドトキシンを測定する場合は、前記兼用前処理剤またはエンドトキシン測定用前処理剤で処理した試料を、少なくともエンドトキシンと反応するC因子系成分を含有したリムルス試薬と混合、反応させることが必要であり、好ましくは該リムルス試薬としてエンドトキシンのみと特異的に反応するものを選択することが極めて好ましい。このようなリムルス試薬としては、C因子系成分を含有し、G因子系成分は、除去もしくは阻害されたものが挙げられる。

【0040】尚、ここで兼用前処理剤とエンドトキシン測定用前処理剤は、場合により混合して使用することもできる。また、 $\beta$ -グルカンを測定する場合は、前記兼用前処理剤または $\beta$ -グルカン測定用前処理剤AもしくはB（尚、これら3種の前処理剤は適宜組み合わせて混合して用いてもよい）で処理した試料を、少なくとも $\beta$ -グルカンと反応するG因子系成分を含有したリムルス試薬と混合、反応させることが必要であり、該リムルス試薬として $\beta$ -グルカンのみと特異的に反応するものを選択することが極めて好ましい。このようなリムルス試薬としては、G因子系成分を含有し、C因子系成分は、除去もしくは阻害されたものが挙げられる。

【0041】従って、エンドトキシンまたは $\beta$ -グルカンを測定する際の反応混合液は、G因子系またはC因子系の至適pH付近に調整されることが好ましく、通常pH7～9になるように從来公知の緩衝液により所望に調整される。なお、本発明の前処理で失活した偽陽性因子、偽陰性因子は、後述の実施例等から活性が再生成ることはないとが示明している。また、逆に、該前処理剤で処理された比較的高濃度の塩基性物質を含む被検液とG因子系成分またはC因子系成分を含有するリムルス試薬との混合において、該前処理剤がG因子系またはC因子系中の各成分の反応性に悪影響を与えることがな

いのも該緩衝作用によるものであると考えられる。

【0042】該反応混合液において、上記被検液の $\beta$ -グルカンまたはエンドトキシンを測定するには、前述したように図1のライセートのG因子系カスケード反応またはC因子系カスケード反応によって活性化されて生成するクロッティングエンザイムの、基質に対するアミダーゼ活性又はプロテアーゼ活性を公知の方法で測定すればよい。ここで、基質とは、合成のものでも天然のものでも任意であり、クロッティングエンザイムによって加水分解されて容易に検出可能な生成物に準れ、反応混合液に酵素反応に基づく変化を生じさせる基質であり、この変化を定性または定量的に測定できればかまわない。

【0043】例えば、 $\beta$ -グルカンまたはエンドトキシン測定用のライセートと、ペプチド合成基質を含む反応系を被検液と接触させて反応を行うことによってアミダーゼ活性を測定することができる。このようなペプチド合成基質としては、上記クロッティングエンザイムの基質となり得るペプチド（例えば、メトキシカルボニル-D-ヘキサヒドロチロシル-G I y-A r g；N末端が保護されたL-u-G I y-A r g、I-l-e-G I u-A l-a-A r g等の配列からなるペプチド）のC末端のアルギニンのカルボキシル基に発色性残基（例えば、p-ニトロアニリン、p-(N,N-ジエチルアミノ)アニリン、p-(N-エチル-N-β-ヒドロキシエチル)アニリン等）、発蛍光性残基（例えば、7-アミノメチルクマリン等）、発光性残基あるいはアンモニアなどがアミド結合により置換したペプチド合成基質が例示される。すなわち、アミダーゼ活性の測定はクロッティングエンザイムがこれらの合成基質に作用して生成する反応生成物（p-ニトロアニリン、アンモニア等）を測定することによって行うことができる。具体的には、上記前処理を施した被検液と、ライセートのG因子系またはC因子系成分を含む反応系に上記ペプチド合成基質を共存させて反応（カスケード反応および必要に応じて生成物の他色素等への変換反応）させ、反応によって生成する色素、発蛍光物質、発光物質またはアンモニアを、それぞれ分光光度計（特公昭63-26871、特公平3-66319等）、蛍光光度計、化学発光測定装置、アンモニア検出用電極（特開昭62-148860）等によって測定するというエンドトキシンの測定に採用されている方法を例示することができる。

【0044】特に、本発明の前処理剤は、マイクロプレート中で該前処理剤で前処理を行い、引き続いでリムルス反応等の生化学反応を行なう測定に有効に使用される。特にカイネティック法における2波長同時測光による測定に好適に使用できるので、迅速、的確な所望物質の測定が可能である。

【0045】一方、クロッティングエンザイムのプロテアーゼ活性の測定には、例えば、凝固酵素の天然基質で

あるコアギュローゲンを含有する $\beta$ -グルカン測定用のリムルス試薬またはエンドトキシン測定用のリムルス試薬に、カスケード反応で生成した凝固酵素が作用して生成するコアギュリンゲル形成反応を、例えば適當な機器（例えば、濁度測定装置、粘度測定装置等）で測定するか、または肉眼で判定するエンドトキシンの測定に採用されている方法（特公平4-14310等）を利用することができる。上記反応に使用されるリムルス試薬としては、前記したようにライセートのG因子を特異的に阻害または吸着、除去した試薬（エンドトキシン用）またはライセートのC因子を特異的に阻害または吸着、除去した試薬（ $\beta$ -グルカン用）が好適に使用される。これらのリムルス試薬には通常コアギュローゲンが含まれているが、もちろん別途添加してもよい。

【0046】本発明による $\beta$ -グルカンの測定法は、真菌感染症、特に診断が極めて困難な深在性真菌感染症の早期診断に、また、エンドトキシンの測定は、グラム陰性菌感染症の早期診断に有用である。真菌感染症の診断を行うためには、真菌感染症が疑われる患者から採取した血液由来試料を本発明の前処理剤で処理した後、 $\beta$ -グルカンを測定し、血液中の $\beta$ -グルカンが一定量（正常値）を超えたときに患者が真菌感染症に罹患していると判断することができる。

【0047】同様にグラム陰性菌の感染症の診断を行うためには、該感染症が疑われる患者から採取した血液由来試料を本発明の前処理剤で処理した後、エンドトキシンを測定し、血液中のエンドトキシンが一定量（正常値）を超えたときに患者がグラム陰性菌感染症に罹患していると判断することができる。

【0048】本発明においては、本発明の前記兼用前処理剤、エンドトキシン測定用前処理剤、 $\beta$ -グルカン測定用前処理剤AまたはB等の前処理剤から選択される1種以上の組合せと、前記エンドトキシン測定用リムルス試薬、 $\beta$ -グルカン測定用リムルス試薬等の1種以上とを適宜組み合わせることにより、所望の測定用キットを構成することができる。

【0049】本発明のキットは、必要により他の任意の構成試薬を付加することができる。そのような試薬としては、エンドトキシンまたは $\beta$ -グルカンの一定量を含有する標準試薬、ブランクテスト用蒸留水、反応試薬溶解・反応用緩衝液等を挙げることができる。該緩衝液としては、グッド緩衝液（例えば、HEPES（N-2-ヒドロキシエチルビペラジン-N'-2-エタンスルホン酸）緩衝液等）、トリス-塩酸緩衝液等が例示できる。

【0050】

【実施例】以下に実施例を挙げ、本発明をさらに具体的

に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例1-1：PRPへの $\beta$ -グルカン添加回収試験（前処理剤のKOH濃度）

血液1ml当たりヘパリンを5ユニット添加して採血した健常人の血液2mlを、150×g、10分間遠心分離して、多血小板血漿（PRP）を得た。

【0051】このPRP試料1.0μlにブクリョウ菌（*Porphyromonas* *coccoides*）由来の $\beta$ -グルカン調製品（ハイママン；齊藤ら、*Agri. Biol. Chem.*, 32, 1261-1269(1968)の方法に従って調製）の0.01M水酸化ナトリウム（NaOH）水溶液（1.0mg/ml）を1.0μl加え、よく混合した後、その5μlを $\beta$ -グルカン・フリーのマイクロプレート（トキシペットプレート96F、生化学工業（株）販売、商品名）にとり、0~1.0モル/lの範囲内で選択された水酸化カリウム（KOH）水溶液（前処理剤）2.0μlを加え（被検液中のKOH濃度は0~0.8モル/lとなる）、37°Cで10分間加温保持し、これを被検液とした。

【0052】被検液に存在する $\beta$ -グルカンの量は、以下の方法で定量した。Obayashi, T. et al. (Clin. Chim. Acta, 149, 55-65 (1985))の方法にしたがってカブトガニ・アメボサイト・ライセートから調製したG因子系成分と発色合成基質（Boc-L-ε-Gly-Arg-pNA（p-ニトロアミドリ））とを含む $\beta$ -グルカン測定用発色合成基質試薬（結晶乾燥品（以下「Gテスト」という）を使用し、被検液25μlに0.2モル/lトリス-塩酸緩衝液（pH8.0）で溶解したGテスト液5.0μlと蒸留水5.0μlを加え、37°Cで30分間加温して反応させ、次いで0.04%（重量/容量）の亜硝酸ナトリウム（1モル/l塩酸溶液）5.0μl、0.3%（重量/容量）スルファミン酸アンモニウム5.0μlならびに0.07%（重量/容量）N-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩（1.4%（重量/容量）N-メチル-2-ピロリドン溶液）5.0μlを順次加えてジアゾカップリングし、マイクロプレートリーダーにより630nmを対照波長として545nmで吸光度を測定（545-630nm）することによって定量した。

【0053】表1に前処理剤溶液のKOH濃度を種々変化させて被検液中のKOH濃度を種々調整した場合の $\beta$ -グルカン添加回収率を、同一条件で前処理された $\beta$ -グルカン無添加のPRPについての測定結果（吸光度）とともに示す。

【0054】

【表1】

【0055】なお、表1中、KOH濃度(モル/1)はPRPを処理するときの被検液における濃度を示し、 $\beta$ -グルカン無添加被検液の吸光度は、 $\beta$ -グルカン無添加前処理PRPについての545-630nm測定の吸光度を示す。 $\beta$ -グルカン添加回収率は、 $\beta$ -グルカンを添加した被検液( $\beta$ -グルカン添加前処理PRP)の回収率を、対照の測定値を100%とした場合の百分率として示す。該対照は、PRPの代わりに注射用生理食塩水を用い、前処理剤の代わりに注射用蒸留水を使用し、 $\beta$ -グルカンを添加したものと無添加について測定した値を基準とする。

【0056】表1によれば、注射用蒸留水のみによる処理では、 $\beta$ -グルカンは全く検出されず、被検液のKOHの濃度を増やして行くと回収率が著しく増加することが判る。また、KOHの濃度が0.6モル/1を超えるか、0.03モル/1より低濃度では $\beta$ -グルカンの回収率が低下するが、0.04~0.4モル/1程度の濃度となるように使用すれば、G因子系反応の偽陽性因子ならびに阻害因子(偽陰性因子)の影響を無くすことができ、PRP中の $\beta$ -グルカンの真の値を正確かつ高い信頼度を以て再現性よく検出することが可能であることが明らかである。

【0057】すなわち、 $\beta$ -グルカン無添加前処理PRPの吸光度が、 $\beta$ -グルカン無添加の対照のそれと同値であるような場合、PRP中のG因子系反応偽陽性因子が完全に変性されたことを示し、また、 $\beta$ -グルカンを添加して測定した実施例（ $\beta$ -グルカン添加前処理PRP）における $\beta$ -グルカンの回収率が100%である場合にPRP中のG因子系反応偽陽性因子（偽陰性因子）が完全に変性されていることを意味する。従って、これらの反応偽陽性因子を同時に変性失活させることができる条件、つまり、 $\beta$ -グルカン無添加前処理PRPの測定値が対照とほぼ同値で、かつ $\beta$ -グルカン添加前処理PRPの $\beta$ -グルカン添加回収率がほぼ100%となる条件が理想的である。

【0058】表1の結果から被検液のKOH濃度が0.04~0.4モル/1であるときが上記の理想的条件を満足する条件であることが示された。

実施例1-2: PRPへの $\beta$ -グルカン添加回収試験  
(前処理剤のNaOH濃度)

実施例1-1と同様の手段により調製したPRP試料190 $\mu$ lに実施例1-1と同じ $\beta$ -グルカン調製品（バキマン）の0.01M NaOH水溶液（1.0ng/ml）を10 $\mu$ l加え（被検液中のNaOH濃度は、0~0.8モル/1となる）、よく混合した後、その5 $\mu$ lをトキシベットプレート96Fにとり、0~0.8モル/1の範囲内で選択されたNaOH水溶液（前処理剤）20 $\mu$ lを加え、37°Cで10分間保持加温し、これを被検液とした。

【0059】被検液に存在する $\beta$ -グルカンの量は、Gテストを使用し、実施例1-1と同様にして測定した。表2にNaOH濃度を種々変化させた場合の $\beta$ -グルカン添加回収率を、同一条件で前処理された $\beta$ -グルカン無添加のPRPについての測定結果（吸光度）とともに示す。

【0060】

【表2】

【0061】なお、表2中、NaOH濃度(モル/1)はPRPを処理するときの被検液における濃度を示し、 $\beta$ -グルカン無添加被検液の吸光度は、 $\beta$ -グルカン無添加前処理PRPについての545-630nm測定の吸光度を示し、 $\beta$ -グルカン添加回収率は、 $\beta$ -グルカンを添加した被検液( $\beta$ -グルカン添加前処理PRP)の回収率を、対照の測定値を100%とした場合の百分率として示す。該対照は、PRPの代わりに注射用生理食塩水を用い、前処理剤の代わりに注射用蒸留水を使用し、 $\beta$ -グルカンを添加したものと無添加について測定した値を基準とする。

【0062】表2によれば、注射用蒸留水のみによる処理では、 $\beta$ -グルカンは全く検出されず、被検液中のNaOH濃度を増やして行くと回収率が著しく増加することが判る。表2の結果から、実施例1-1のKOH水溶液を前処理剤として使用した場合と同様に、被検液中のNaOH濃度が0.04~0.4モル/1となるようなNaOH水溶液を前処理剤として使用したときに、PRP中の偽陽性因子及び偽陰性因子の影響を除去できることが判った。

【0063】実施例1-3：血清への $\beta$ -グルカン添加回収試験(処理時間)

抗凝固剤を入れないで採血した健常人の血液3mlを4°Cに1時間静置した後、1,000×g、10分間遠心分離して血清を得た。この血清試料190μlに10pgの実施例1と同じβ-グルカン調製品(バキマン)を含有する水溶液10μlを添加した後、その5μlをトキシペットプレート96Fにとり、0.1モル/lのKOH水溶液〔前処理剤〕20μlを加え、37°Cにおいて所

定の時間加温保持し、これを被検液とした。

【0064】そして、上記被検液に添加されたβ-グルカンを実施例1の場合と同様の手段により測定した。各加温時間についての測定結果を実施例1-1の場合と同様に表3として示す。

【0065】

【表3】

【0066】表3によると、加温時間0すなわち、該前処理剤を添加した後、直ちに被検液とした場合にはβ-グルカンの回収率は非常に低い。これに対して5分～40分の加温時間を経たものを使用すれば血清に添加した

β-グルカンを定量的に検出することができた。すなわち、このような条件で前処理した際には偽陽性因子及び阻害因子を変性することができ、血清中のβ-グルカンの真の値を正確かつ高い信頼度を以て再現性よく検出す

ることが可能であることが明らかである。

【0067】実施例1-4: PPPへの $\beta$ -グルカン添加回収試験（前処理温度）

血液1ml当たりヘパリンを5ユニット添加して採血した健常人の血液2mlを1,000×g、10分間遠心分離して、黄血小板血漿（PPP）を得た。このPPP試料190μlに40pgのアルカリゲネス・フェカリス・バール・ミキソゲネス（*Alcaligenes faecalis var. myxogenes*）IFO 13140由来の $\beta$ -グルカン（カードラン；和光純薬工業（株）販売）を含有する0.01モル/l NaO

H水溶液10μlを添加した後、その5μlをトキシベットプレート96Fにとり、0.1モル/l KOH溶液20μlを加え、所定の温度において10分間加温保持し、これを被検液とした。

【0068】そして、上記被検液に添加された $\beta$ -グルカンを実施例1-1の場合と同様の手段により測定した。各加温温度についての測定結果を実施例1-1の場合と同様に表4として示す。

【0069】

【表4】

【0070】表4によれば、処理温度が4°Cの場合には $\beta$ -グルカンの回収率が低かったが、25°C以上の温度で処理すればPPPに添加した $\beta$ -グルカンを定量的に検出することができた。

実施例1-5：真菌感染症患者PRP検体の測定

真菌感染症の罹患が疑われる患者から実施例1と同様の方法で採血し、PRP検体を調製した。その5 $\mu$ lをトキシペットフレート96Fの各ウェルにとり、さらに0.1モル/lNaOH水溶液（前処理剤）20 $\mu$ lを

加え、37°Cで10分間加温保持し、被検液とした。以後実施例1-1と同様の手段によりGテストと反応させ、吸光度を測定した。実施例1-4と同じ既知量のカーボランを標準試薬として用い、別に作成した検量線より上記被検液中の $\beta$ -グルカン含量を換算した結果を表5に示す。

【0071】

【表5】

【0072】表5に示したように全例（No. 1～No. 6）において高濃度の $\beta$ -グルカンが検出され（健

常人の $\beta$ -グルカン含量：0.2±0.3pg/ml）、そのうちの3例（No. 1～No. 3）については、血

培にて、カンジダ・アルビカンス (Candida albicans)、カンジダ・トロピカリス (Candida tropicalis) およびクリプトコッカス・ネオフォルマンス (Cryptococcus neoformans) をそれぞれ検出し、1例 (No. 4) は血培では陰性であったが、死亡後の解剖による組織病理学的検査によりアスペルギルス・フミガタス (Aspergillus fumigatus) を検出した。残り2例 (No. 5, No. 6) については、臨床症状、経過、薬剤感受性等から真菌感染を強く疑ったにもかかわらず血培では陰性であったが、抗真菌剤 (ミコナゾール) 投与により、臨床的に顕著な改善を見たことから真菌に感染していたものと考えられる。

【0073】従って、真菌感染症患者のPRPを本発明の前処理剤で処理した後にβ-グルカンを測定することによって、真菌感染症、とりわけ通常の検査法では診断

がきわめて困難な深在性真菌感染症の診断を迅速かつ正確に行うことができた。

#### 実施例1-6：真菌感染症患者血清検体の測定

真菌感染症の罹患が疑われる患者から実施例1-3と同様の方法で採血し、血清検体を調製した。その5μlをトキシペットプレート96Fの各ウェルにとり、さらに0.1モル/1 KOH水溶液 (前処理剤) 20μlを加え、37°Cで10分間加温保持し、被検液とした。以後実施例1と同様の手段によりGテストと反応させ、吸光度を測定した。実施例1-4と同じ既知量のカードランを標準試薬として用い、別に作成したの検量線より上記被検液中のβ-グルカン含量を換算した結果を表6に示す。

【0074】

【表6】

【0075】表6に示したように全例 (No. 1～No. 5) において高濃度のβ-グルカンが検出され (健常人のβ-グルカン含量: 0.2±0.2 pg/ml)、そのうちの2例 (No. 1, No. 2) については、血培にて、カンジダ・グリエルモンディ (*Candida guilliermondii*) およびカンジダ・クルセイ (*Candida krusei*) をそれぞれ検出し、1例 (No. 3) は血培では陰性であったが、死亡後の解剖による組織病理学的検査によりアスペルギルス・フミガツス (*Aspergillus fumigatus*) を検出した。残り2例 (No. 4, No. 5)

については、臨床症状、経過、薬剤感受性等から真菌感染を強く疑ったにもかかわらず血培では陰性であったが、抗真菌剤 (アムホテリシンB、フルコナゾール) 投与により、臨床的に顕著な改善を見たことから真菌感染症に感染していたものと考えられる。

【0076】従って、真菌感染症患者の血清を本発明の前処理剤で処理した後にβ-グルカンを測定することによって、真菌感染症、とりわけ通常の検査法では診断がきわめて困難な深在性真菌感染症の診断を迅速かつ正確に行うことができた。

実施例1-7: β-グルカン測定用ゲル化法 (比濁法)

## キット

下記の構成試薬からなる、 $\beta$ -グルカン測定用ゲル化法（比濁法）キット（50検体用）を作成した。

(A) 前処理剤 1. 0ml

0. 1モル/1 NaOH水溶液

(B) G因子系反応試薬（凍結乾燥品） 適量

リムルス・ボリフェムス由来の市販ライセート（リムルスHS11-テストワコー、和光純薬工業（株）販売）に1.5%（W/V）デキストラン（分子量70,000）を添加し、3,500rpmで10分間遠心分離後、多孔性セルロースグレル（セルロファインGC-200m、生化学工業（株）販売）と混合し、ガラスフィルターで通過し、その汎液を凍結乾燥したもの。

(C) G因子系反応試薬溶解・反応用緩衝液 5. 0ml

0. 1モル/1 トリス-塩酸緩衝液（pH8. 0）

(D) 標準 $\beta$ -グルカン試薬（凍結乾燥品） 適量

市販カードラン（実施例1-4参照）

(E) 標準 $\beta$ -グルカン試薬溶解用蒸留水（ $\beta$ -グルカン・フリー） 1. 0ml

(F) ブランクテスト用蒸留水（ $\beta$ -グルカン・フリー） 1. 0ml

実施例1-8： $\beta$ -グルカン測定用発色合成基質法キット

下記の構成試薬からなる、 $\beta$ -グルカン測定用発色合成基質法キット（100検体用）を作成した。

(A) 前処理剤 2. 0ml

0. 1モル/1 KOH水溶液

(B) G因子系反応試薬（凍結乾燥品） 適量

タキプレウス・トリデンタツ由来のライセートに1.5%（W/V）デキストラン（分子量40,000）を添加し、3,500rpmで10分間遠心分離後、孔径0. 20μmのナイロン膜フィルター（ナルゲンシリジングフィルター、直径2.5mm、ナルジッシュ社製）を通過させ、通過液をMS混液（0. 8M塩化マグネシウムと6mM Boc-L-*Leu*-Gly-Arg-pNAとを含む）に添加し、凍結乾燥したもの。

(C) G因子系反応試薬溶解・反応用緩衝液 5. 0ml

0. 2モル/1 トリス-塩酸緩衝液（pH8. 0）

(D) 標準 $\beta$ -グルカン試薬（凍結乾燥品） 適量

アクリヨウ歯由來の $\beta$ -グルカン調製品（パキマン）

（実施例1-1参照）

(E) 標準 $\beta$ -グルカン試薬溶解用蒸留水（ $\beta$ -グルカン・フリー） 2. 0ml

(F) ブランクテスト用蒸留水（ $\beta$ -グルカン・フリー） 2. 0ml

【0077】実施例2-1：PRPへのエンドトキシン添加回収試験（前処理剤のポリブレン濃度）

血液1ml当たりヘパリンを2ユニーク添加して採血した健常人の血液2mlを、1.50×g、10分間遠心分離し

て、多血小板血漿（PRP）を得た。

【0078】このPRP試料1.90μlに大腸菌0111B4株由來のエンドトキシン調製品の水溶液（2ng/ml）1.0μl加え、よく混合した後、その5μlを反応容器としてエンドトキシン・フリーのマイクロプレート（トキシベットプレート96F、生化学工業（株）販売、商品名）にとり、前処理剤として、0. 1モル/1 KOH、0. 01モル/1 塩化カルシウム（CaCl<sub>2</sub>）、0. 1%（重量/容量）トリントンX-100を含有する水溶液に0. 01~0. 5%（重量/容量）になるようにポリブレンを添加した水溶液の混液（20μl）を加え、強制エア-循環式マイクロプレートリーター（ウェルリーダーSK601、生化学工業（株）販売、商品名）で37°C、10分間保持した。この被検液2.5μlにエンドトキシン特異的合成基質法リムルステスト試薬（エンドスペーザーES-200、生化学工業（株）販売、商品名）1.00μl（0. 1モル/1 トリス-塩酸緩衝液、pH8. 0、5. 6mlに溶解）を添加して、37°C、30分間反応させた。4.92nmを対照とする4.05nmの吸光度を1.5秒間隔で2波長測光し、1分間当たりの吸光度変化率（mAbs/min）を算出した（カイネティック法）。PRPおよび前処理剤の代わりにDW（蒸留水）を使用したときの測定値をコントロールとし、PRP 1ml当たりのエンドトキシン濃度とエンドトキシン添加回収率を算出した。また、同時に前処理容器として試験管を用い、ポリブレンを含有しないいわゆる-1記と組成の前処理剤で37°Cの恒温水槽中において同様に前処理した被検液2.5μlを試験管にとり、恒温水槽中で37°C、30分間反応させた。0. 04%（重量/容量）の亜硝酸ナトリウム（1モル/1 塩酸溶液）5.0μl、0. 3%（重量/容量）スルファミン酸アンモニウム5.0μlならびに0. 07%（重量/容量）N-1-ナフチルエチレンジアミニ三塩酸塩（1.4%（重量/容量）N-メチル-2-ビロドン溶液）5.0μlを順次加えてジアゾカップリングした後、その全量をマイクロプレートに移し、ウェルリーダーにより、630nmを対照として545nmで吸光度を測定し、PRP 1ml当たりのエンドトキシン濃度と回収率を算出した（エンドポイント法）。表7に前処理および反応容器としてマイクロプレートを使用したカイネティック法による、前処理剤のポリブレン濃度を種々変化させた場合のエンドトキシン添加回収率を同一条件で処理されたエンドトキシン無添加のPRPについての測定結果（吸光度およびエンドトキシン換算値）と共に示す。また前処理および反応容器に試験管を使用し、ポリブレンを含有しない前処理剤による結果も同様に示した。

【0079】

【表7】

【0080】表7によれば、エンドトキシン添加回収率はポリブレン添加の有無によらず、100%と良好な結果を与えるが、エンドトキシン無添加での血中エンドトキシン濃度換算値はポリブレンの濃度により0~30 pg/mlと非常に変動が大きい事が分かる。反応容器としてマイクロフレートの代わりに試験管を用いたエンドトキシン法による測定結果は、0 pg/mlである。マイクロフレートを用いたカイネティック法でこのような顕著な偽陽性反応を生じる原因としては、マイクロフレート内での少液量（すなわち、検体の濃度は逆に高い）においては、その反応時における検体特有の非特異的濁度の上昇を挙げることができる。その結果として、該濁度上昇が有意の変化率として計測され、エンドトキシンに依存する変化率と実質的に区別がつかなくなることによるものである。このような非特異的濁度の増加を抑える添加剤としては、ポリブレンが効果的で、通常前処理剤中0.05~0.3%、より好ましくは0.1~0.2%の濃度で使用すれば良い。このような条件下においては、PRP中のエンドトキシンの真の濃度を正確にかつ迅速に再現性良く検出することが可能であることが明らかである。

【0081】実施例2-2

#### グラム陰性菌感染症患者PRP検体の測定

対象は、健常人30例（エンドトキシン含量：2.42±2.99 g/ml）ならびにグラム陰性菌による敗血症を疑った白血病等の重症血液疾患および感染を合併した肝、胆道疾患有する患者の10例で、それぞれヘパリンを添加して無菌的に採血した血液を、4°Cで150×g、10分間遠心してPRP検体を得た。その5μlをトキシペットプレート96Fにとり、0.1%トリトンX-100、0.1モル/1 KOH、0.03モル/1ビシン（前処理剤の溶解性を高めるために添加したグッド緩衝剤、（株）同仁化学研究所製造、一般名）、0.07%EIP（エチレンイミンポリマー）、0.01モル/1 CaCl<sub>2</sub>および0.1%ポリブレンからなる前処理剤20μlを加え、37°Cに10分間保持し、被検液とした。

【0082】そして、実施例2-1の場合と同様にカイネティック法により、エンドトキシンを測定した。表8に本実施例の結果を、別に作成した検量線より求めたエンドトキシン換算量として表した。

【0083】

【表8】

検体	エンドトキシン (pg/ml)
健常人 (30例)	2.42 ± 2.9
患者	
1	25.5
2	54.2
3	170.3
4	18.5
5	428.5
6	20.0
7	127.4
8	32.1
9	31.5
10	259.7

【0084】表8の患者1～10は、血培、白血球数その他の検査成績および発熱等の臨床症状からグラム陰性菌敗血症の疑い有りと診断された症例であり、本発明方法においては、全例高濃度のエンドトキシンが検出された。なお、上記P.R.P.の代わりにPPPを検体として使用しても同様の結果が得られた。通常の検査法では確定診断が極めて困難なグラム陰性菌敗血症の迅速診断法として極めて有力な手法として評価されるものであることが理解できよう。

【0085】実施例2-3：エンドトキシン測定用発色合成分質法キット

下記の構成試薬からなる、エンドトキシン測定用発色合成分質法キット (100検体用) を作成した。

(A) 前処理剤 2.0ml

A液: 0.2モル/1 KOH、0.2%ポリブレン

B液: 0.2%トリpton-X-100、0.14%エチレングリミンポリマー、0.02モル/1 CaCl<sub>2</sub>、0.06モル/1 ビシン

使用直前にA液とB液を混合する。

(B) C因子系反応試薬 (凍結乾燥品) 適量

タキプレウス・トリデクタス由来のライセートからayashi, T. et al. の方法 (前出) に従って調製したC因子系成分と発色合成分質 (Boc-L-Arg-Gly-Arg-pNA) を含む凍結乾燥品。

(C) C因子系反応試薬溶解・反応用緩衝液 5.0ml 0.2モル/1 トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0)

(D) 標準エンドトキシン試薬 (凍結乾燥品) 適量  
大腸菌O111:B4株由来のエンドトキシン調製製

#### 品

(E) 標準エンドトキシン試薬溶解用蒸留水 (エンドトキシン・フリー) 2.0ml

(F) ブランクテスト用蒸留水 (エンドトキシン・フリー) 2.0ml

(G) 0.2モル/1 トリス-塩酸緩衝液調製用蒸留水 (エンドトキシン・フリー) 2.0ml

実施例3-1：P.R.P.へのβ-グルカン添加回収試験  
(前処理剤のポリブレン濃度)

実施例2-1と同様の手段により調製したP.R.P.試料1.90μlにブリキョウ菌 (*Poria cocos*) 由来のβ-グルカン調製品 (バキマン) の水溶液 (4ng/ml) 1.0μlを加え、よく混合した後、その5μlをβ-グルカン・フリーのマイクロプレート (トキシペットプレート96F、生化学工業 (株) 販売、商品名) に取り、前処理剤として0.1モル/1 KOHおよび0.3モル/1 塩化カリウム (KC1) を含有する水溶液に0.01～0.5% (重量/容量) になるようにポリブレンを添加した水溶液の混液 (2.0μl) を加え、強制エア-循環式マイクロプレートリーダー (ウェルリーダーSK601、生化学工業 (株) 販売、商品名) 内で37°C、10分間保持した。

【0086】被検液に存在するβ-グルカンの量は以下の方法で測定した。被検液2.5μlに、0.1モル/1 HEPES緩衝液 (pH 7.6) で溶解したGテスト

(G因子系成分と発色合成分質、Boc-L-Arg-Gly-Arg-pNAを含むβ-グルカン測定用発色合成分質法試薬凍結乾燥品；実施例1-1参照) 1.00μl

を添加して、37°Cで30分間反応させた。4.92 nmを対照とする40.5 nmの吸光度を15秒間隔で2波長測光し、1分間当たりの吸光度変化率(mAbs/mi n)を算出した(カイネティック法)。PRPおよび前処理剤の代わりにDWを使用したときの測定値をコントロールとし、PRP 1ml当たりのβ-グルカン濃度とβ-グルカン添加回収率を算出した。また、同時に前処理容器として試験管を用い、ポリブレンを含有しないほかは上記と同じ組成の前処理剤で37°Cの恒温水槽において同様に前処理した被検液2.5μlを試験管にとり、恒温水槽で37°C、30分間反応させた。0.04% (重量/容量) の亜硝酸ナトリウム(1モル/1 塩酸溶液) 5.0μl、0.3% (重量/容量) スルファミン酸アンモニウム5.0μlならびに0.07% (重量/容量) N-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩(1.4

(重量/容量) N-メチル-2-ピロリドン溶液) 5.0μlを順次加えてジアツカッピングした後、その全量をマイクロプレートに移し、ウェルリーダーにて6.30nmを対照として5.45 nmで吸光度を測定し、PRP 1ml当たりのβ-グルカン濃度と回収率を算出した(エンドポイント法)。表9に前処理および反応容器としてマイクロプレートを使用したカイネティック法による、前処理剤のポリブレン濃度を種々変化させた場合のβ-グルカン添加回収率を同一条件で処理されたβ-グルカン無添加のPRPについての測定結果(吸光度およびβ-グルカン換算値)と共に示す。また前処理および反応容器に試験管を使用し、ポリブレンを含有しない混液の結果も同様に示した。

## 【0087】

【表9】

ポリブレン (処理液中の濃度: %)	β-グルカン無添加		添加回収率 (%)
	mAbs/min	β-グルカン換算値 (pg/ml)	
0	1.8	3.0	100
0.01	0.9	1.5	100
0.05	0.9	1.4	100
0.1	0.7	1.0	100
0.2	0.8	1.1	100
0.3	0.9	1.3	100
0.5	1.3	1.9	100
0(†)	—	1.0	100

(†): 試験管を用いたエンドポイント法

【0088】表9によれば、β-グルカン添加回収率はポリブレン添加の有無によらず、1.00%と良好な結果を与えるが、β-グルカン無添加での血中β-グルカン濃度換算値はポリブレンの濃度により1.0~3.0 pg/mlと非常に変動が大きい事が分かる。反応容器としてマイクロプレートの代わりに試験管を用いた測定結果より、本来は1.0 pg/mlでなければならぬのに、このような誤差を偽陽性反応を生じる原因としては、エンドトキシンの場合と同様、反応時における検体特有の非特異的濃度上昇を挙げることができる。その結果として、該濃度上昇が有意の変化率として計測され、β-グルカンに依存する変化率と実質的に区別がつかなくなることによるものである。このような非特異的濃度の増加を抑える添加剤としては、実施例2-1と同様、ポリブレンが効果的で、通常前処理在中0.05~0.3%、

より好ましくは0.1~0.2%の濃度で使用すれば良い。

## 【0089】実施例3-2: 真菌感染症患者PRP検体の測定

真菌感染症の罹患が疑われる患者から実施例2-1と同様の方法で採血し、PRP検体を調製した。その5μlをトキシペットプレート96Fの各ウェルにとり、さらに前処理剤として0.1モル/1 NaOH、0.3モル/1 NaClおよび0.2%ポリブレンからなる混液2.0μlを加え、37°Cで10分間加温保持し、被検液とした。以後実施例3-1と同様の手段によりGテストと反応させ、吸光度変化率を自動測定した。実施例3-1と同じ既知量のブクリョウ菌由来のβ-グルカンを標準試薬として用い、別に作成した検量線より上記被検液中のβ-グルカン含量を換算した結果を表10に示す。

【0090】

【表10】

表10 日和見の深在性真菌感染症の血漿 (PRP) 中  $\beta$ -グルカン濃度

No.	疾患	PRP $\beta$ -グルカン	血培	臨床症状	転帰
1	ALL	403.0 pg/ml	(+)	カンジダ・アルビカンス分離	死亡
2	AML	30.5	(+)	カンジダ・トロビカリス分離	死亡
3	AML	650.4	(+)	アリトロ・オルガニス分離	生存
4	AML	62.5	(-)	全身性アスペルギルス症 (死体解剖)	死亡
5	ALL	95.0	(-)	ミコナゾールにより改善	生存
6	AML	47.2	(-)	ミコナゾールにより改善	生存

A L L : 急性リンパ性白血病、A M L : 急性骨髓性白血病、A I H A : 自己免疫性溶血性貧血

【0091】表10に示したように全例 (No. 1~No. 6) において高濃度の  $\beta$ -グルカンが検出され (健常人の  $\beta$ -グルカン含量 (18例) : 8. 0 ± 4. 0 pg/ml)、そのうちの3例 (No. 1~No. 3) については、血培にて、カンジダ・アルビカンス (Candida albicans)、カンジダ・トロビカリス (Candida tropicalis) およびクリプトコッカス・ネオフォルマンス (Cryptococcus neoformans) をそれぞれ検出し、1 例 (No. 4) は血培では陰性であったが、死亡後の解

剖による組織病理学的検査によりアスペルギルス・フミガタス (Aspergillus fumigatus) を検出した。残り2例 (No. 5、No. 6) については、臨床症状、経過、薬剤感受性等から真菌感染を強く疑ったにもかかわらず血培では陰性であったが、抗真菌剤 (ミコナゾール) 投与により、臨床的に顯著な改善を見たことから真菌に感染していたものと考えられる。なお、上記PRPのかわりにPPPを検体として使用しても同様の結果が得られた。

【0092】従って、真菌感染症患者の血漿検体 (PR

P、PPP)を本発明の前処理剤で処理した後に $\beta$ -グルカンを測定することによって、真菌感染症、とりわけ通常の検査法では診断がきわめて困難な深在性真菌感染症の診断を迅速かつ正確に行うことができた。

実施例3-3：真菌感染症患者血清検体の測定

真菌感染症の罹患が疑われる患者から実施例3-1と同様の方法で採血し、血清検体を調製した。その5μlをトキシペットプレート96Fの各ウェルにとり、さらに前処理剤として0.1モル/1 KOH、0.3モル/1

NaClおよび0.1%ポリブレンからなる混液20μlを加え、37°Cで10分間加温保持し、被検液とした。以後実施例3-1と同様の手段によりGテストと反応させ、吸光度の変化率を自動測定した。実施例3-1と同じ既知量のブクリョウ菌由来の $\beta$ -グルカンを標準試薬として用い、別に作成した検量線より上記被検液中の $\beta$ -グルカン含量を換算した結果を表11に示す。

【0093】

【表11】

表11 日和見の深在性真菌感染症の血清中 $\beta$ -グルカン濃度

No.	疾患	血清 $\beta$ -グルカン	臨床状況		転帰
			血培	臨床	
1	MM APML	475.0 104.8	(+)	カンジダ・グリエルモンディ分離 カンジダ・クルセイ分離 全身性アスペルギルス症 (死体解剖)	生存 生存
2	APML	158.1	(+)	フルコナゾールにより改善	死亡
3	AML	750.5	(-)		生存
4	ALL	345.0	(-)	アムホテリシンBにより改善	生存

MM：多発性骨髓腫、APML：急性前骨髓球性白血病、AML：急性粒性白血病、  
ALL：急性リンパ性白血病

【0094】表11に示したように全例(No. 1～No. 5)において高濃度の $\beta$ -グルカンが検出され(健

常人の $\beta$ -グルカン含量(18例)：7.2±2.9pg/ml)、そのうちの2例(No. 1、No. 2)につ

いては、血培にて、カンジダ・グリエルモンディ (Candida guilliermodi) およびカンジダ・クルセイ (Candida krusei) をそれぞれ検出し、1例 (No. 3) は血培では陰性であったが、死亡後の解剖による組織病理学的検査によりアスペルギルス・フミガツス (Aspergillus fumigatus) を検出した。残り2例 (No. 4、No. 5) については、臨床症状、経過、薬剤感受性等から真菌感染を強く疑ったにもかかわらず血培では陰性であったが、抗真菌剤 (アムホテリシンB、フルコナゾール) 投与により、臨床的に顯著な改善を見たことから真菌感染症に感染していたものと考えられる。

【0095】従って、真菌感染症患者の血清を本発明の前処理剤で処理した後にβ-グルカンを測定することによって、真菌感染症、とりわけ通常の検査法では診断がきわめて困難な深在性真菌感染症の診断を迅速かつ正確に行うことができた。

実施例3-4: β-グルカン測定用ゲル化法 (比濁法) キット

下記の構成試薬からなる、β-グルカン測定用ゲル化法 (比濁法) キット (50検体用) を作成した。

(A) 前処理剤 1.0ml

0.1モル/1 KOH-0.05モル/1 KCl-0.

2%ポリブレン水溶液

(B) G因子系反応試薬 (凍結乾燥品) 適量

リムルス・ボリフェムス由來の市販ライセト (リムルスHSII-1テストワゴン、和光純業工業 (株) 販売) に15% (W/V) デキストラン (分子量70,000) を添加し、3,500rpmで10分間遠心分離後、多孔性セルロースゲル (セルロファインGC-200m、生化学工業 (株) 販売) と混合し、ガラスフィルターで涙過し、その涙液を凍結乾燥したもの。

(C) G因子系反応試薬溶解・反応用緩衝液 5.0ml  
0.1モル/1 HEPES緩衝液 (pH 7.6)

(D) 標準β-グルカン試薬 (凍結乾燥品) 適量

ブクリョウ菌由來のβ-グルカン調製品 (バキマン)

(E) 標準β-グルカン試薬溶解用蒸留水 (β-グルカン・フリー) 1.0ml

(F) ブランクテスト用蒸留水 (β-グルカン・フリー) 2.0ml

実施例3-5: β-グルカン測定用発色合成基質法キット

下記の構成試薬からなる、β-グルカン測定用発色合成基質法キット (100検体用) を作成した。

(A) 前処理剤 2.0ml

0.1モル/1 KOH-0.3モル/1 KCl-0.1%ポリブレン水溶液

(B) G因子系反応試薬 (凍結乾燥品) 適量

タキブレウス・トリデンタツス由來のライセトに15% (W/V) デキストラン (分子量40,000) を添加し、3,500rpmで10分間遠心分離後、孔径0.20μmのナイロン膜フィルター (ナルゲンシンジフィルター、直径2.5mm、ナルジン社製) を通過させ、通過液をMS混液 (0.8M塩化マグネシウムと6mM Boc-L-Leu-Gly-Arg-pNAとを含む) に添加し、凍結乾燥したもの。

(C) G因子系反応試薬溶解・反応用緩衝液 5.0ml  
0.2モル/1 HEPES緩衝液 (pH 7.6)

(D) 標準β-グルカン試薬 (凍結乾燥品) 適量

ブクリョウ菌由來のβ-グルカン調製品 (バキマン)

(実施例3-4参照)

(E) 標準β-グルカン試薬溶解用蒸留水 (β-グルカン・フリー) 2.0ml

(F) ブランクテスト用蒸留水 (β-グルカン・フリー) 2.0ml

(G) 0.1モル/1 HEPES緩衝液調製用蒸留水  
(β-グルカン・フリー) 5.0ml

【0096】実施例4-1

感染症患者PRP検体の測定

対象は、健常人18例、グラム陰性菌による敗血症を疑った白血病等の重症血液疾患および感染を合併した肝、胆道疾患有を有する患者の10例ならびに真菌症が疑われる患者6例で、それぞれヘパリンを添加して無菌的に採血した血液を、4°Cで150×g、10分間遠心してPRP検体を得た。その5μlをトキシペットプレート96Fにとり、0.1モル/1 KOHおよび0.1%ポリブレンからなる混液20μlを加え、37°Cに10分間保持し、被検液とした。

【0097】エンドトキシンの測定は、実施例2-1の場合と同様にエンドスペーサーを用いたカイネティック法により行い、既知量のエンドトキシン (大腸菌O11: B4株由來) を標準試薬として用い、別に作成した検量線より被検液中のエンドトキシン含量を算出した。β-グルカンの測定は、実施例3-1と同様にGテストを用いたカイネティック法により行い、既知量のβ-グルカン調製品 (ブクリョウ菌由來バキマン) 標準試薬として用い、別に作成した検量線より被検液中のβ-グルカン含量を算出した。表12に結果をまとめて示す。

【0098】

【表12】

検体	エンドトキシン (pg/ml)
患者 1	22.7
2	50.8
3	170.0
4	15.9
5	416.8
6	17.5
7	113.3
8	30.9
9	30.5
10	242.8
検体	$\beta$ -グルカン (pg/ml)
患者 11	402.5
12	27.6
13	635.2
14	60.7
15	88.6
16	45.7

【0099】表12の患者No. 1～10は、グラム陰性菌敗血症の疑い有りと診断された症例であり、本発明方法においては、全例高濃度のエンドトキシンが検出された（健常人のエンドトキシン含量（18例）： $2.0 \pm 2.5 \text{ pg/ml}$ ）。なお、上記PRPの代わりにPPPを検体として使用しても同様の結果が得られた。また、表12の患者No. 11～16は、真菌感染症の罹

患を疑われた症例であるが、他の検査では全例については確認できなかった。上記方法では全例について高濃度の $\beta$ -グルカンが検出された（健常人の $\beta$ -グルカン含量（18例）： $7.0 \pm 2.5 \text{ pg/ml}$ ）。

【0100】なお、上記PRPの代わりにPPPを検体として使用しても同様の結果が得られた。以上の結果から、同一前処理剤で処理した検体を用いてエンドトキ

ンと $\beta$ -グルカンをそれぞれ測定できることが確認された。

【0101】

【発明の効果】本発明は、種々の生化学反応が適用される血液等の生体試料の前処理を効率的に行うことができる前処理剤を提供でき、特に、G因子系反応妨害因子を含む血漿、血清等の生体由来試料中の $\beta$ -グルカンを測定する際、またはC因子系反応妨害因子を含む該試料中のエンドトキシンを測定する際、該試料をアルカリ金属水酸化物およびヘキサジメトリン化合物を必須成分とする前処理剤で処理するという簡単な手段を採用することによって上記反応妨害因子の反応系への影響を完全に除去するとともに、処理後の被検液の濁度の上昇を抑制することができた。また、処理後に変性析出物を分離除去する必要がないので全操作行程を短縮することができた。さらに、本発明の測定法は、生体試料由来中のエン

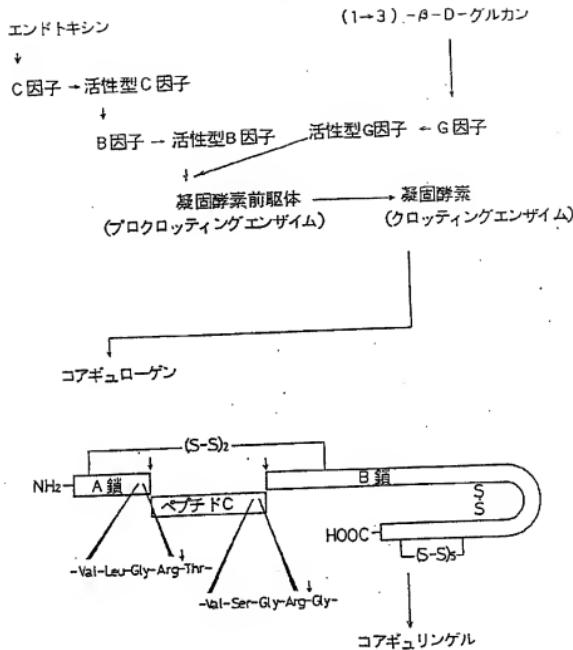
ドトキシンまたは $\beta$ -グルカンをマイクロプレート中でカイネティック法により自動測定することができるので、簡易、迅速かつ高精度で再現性の高い結果が得られる。本発明の測定法を臨床検査に応用することによって、通常の検査法では診断がきわめて困難な深在性真菌感染症、グラム陰性菌感染症の診断を迅速かつ正確に行うことができる。

【0102】また、生体由来試料中の $\beta$ -グルカンを測定する際、該試料をアルカリ金属水酸化物を必須成分とする前処理剤で処理すると、G因子系反応妨害因子のG因子系反応への影響を完全に除去することができた。

【図面の簡単な説明】

【図1】カブトガニ・アメボサイト・ライセートの(1→3)- $\beta$ -D-グルカン及びエンドトキシンによるカスケード反応の反応機構を示す。

【図1】



## 【手続補正書】

【提出日】平成5年5月21日

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0022

## 【補正方法】変更

## 【補正内容】

【0022】以下、本発明の前処理剤について具体的に述べる。本発明の汎用前処理剤は、少なくともヘキサジメトリン化合物とアルカリ金属水酸化物からなる。このアルカリ金属水酸化物は、カリウム、リチウム、ナトリウム等のアルカリ金属の水酸化物であり、具体的には水酸化カリウム (KOH)、水酸化リチウム (LiO)

H)、水酸化ナトリウム (NaOH) 等である。該前処理剤としては通常単独又は複数のアルカリ金属水酸化物を含む水溶液が使用される。最も好ましいのはKOH及びNaOHである。

## 【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0023

## 【補正方法】変更

## 【補正内容】

【0023】前処理剤中のアルカリ金属水酸化物の濃度は、通常、被検液中の該アルカリ金属水酸化物濃度が0.04~0.4モル/lとなるように調整することが

好みしい。本発明に使用されるヘキサジメトリン化合物は、好みしくは、ヘキサジメトリンの塩、例えば、ヘキサジメトリンハロゲン化物が挙げられる。ヘキサジメトリンハロゲン化物としては、ヘキサジメトリンプロマイド（一般名：ボリブレン）、ヘキサジメトリンクロライド等が好みしいものとして例示されるが、本発明においては、これらハロゲン化物等に限定されるものでなく、所望によりヘキサジメトリンの水素原子を他の置換基、例えば、炭素数1～6のアルキル基（メチル、エチル等）などで置換されたヘキサジメトリン誘導体の塩をも含むものである。最も好みしいものは、ヘキサジメトリンプロマイドである。

## 【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0029

【補正方法】変更

【補正内容】

【0029】エンドトキシン測定用前処理剤は、組成成分として前記兼用前処理剤の組成成分に非イオン性界面活性剤もしくは陰イオン性界面活性剤、およびアルカリ土類金属ハロゲン化物を少なくとも追加した構成である。ここで、非イオン性界面活性剤としては、特に制限はないが、ポリオキシエチレンエーテル類、ポリオキシエチレンソルビタンアルキルエステル類およびアルキルグルコシド類等が挙げられる。

## 【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0030

【補正方法】変更

【補正内容】

【0030】ポリオキシエチレンエーテル類としては、ポリオキシエチレン-p-ターナシャリーオクチル（又はイソオクチル）フェニルエーテル（重合度8～40）、ポリオキシエチレン-4-ターナシャリーオクチル（又はイソオクチル）シクロヘキシルエーテル（重合度8～40）、ポリオキシエチレン-p-ノニルフェニルエーテル（重合度9～15）、ポリオキシエチレンヘプタメチルヘキシルエーテル（重合度10～20）、ポリオキシエチレンドデシルエーテル（重合度10～29）等が挙げられ、市販品としてはトリトン系（Triton series）界面活性剤（octoxynol; polyoxyethylene p-t-octylphenyl ethers）、ブリジ系（Brij series）界面活性剤（polyoxyethylene alkyl ethers）及びエマルゲン系（Emulgen series）界面活性剤（polyoxyethylene nonylphenyl ethers）が含まれる。

## 【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0031

【補正方法】変更

【補正内容】

【0031】アルキルグルコシド類としては、n-ヘプチル（ $\alpha$ -又は $\beta$ -）D-グルコビラノシド、n-オクチル（ $\alpha$ -又は $\beta$ -）D-グルコビラノシド、n-ノニル（ $\alpha$ -又は $\beta$ -）D-グルコビラノシド、n-デシル（ $\alpha$ -又は $\beta$ -）D-グルコビラノシド、又はn-ドデシル（ $\alpha$ -又は $\beta$ -）D-グルコビラノシド等が挙げられる。

## 【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0032

【補正方法】変更

【補正内容】

【0032】ポリオキシエチレンソルビタンアルキルエステル類としては、ポリオキシエチレンソルビタン（重合度約20）のモノラウレート、モノハリミテート、モノステアレート、モノオレエート又はトリオレエート等が挙げられ、市販品としてはトゥイーン系（Tween series）界面活性剤が含まれる。トリトン系界面活性剤としては、トリトン（Triton）X-100、X-114、X-102、X-165、X-305、X-405、1-gepal CA-630、Neutronyx 605、Conco NIX-100、/ニネット（Nonidet）P-40等が例示される。ブリジ系界面活性剤としては、ブリジ（Brij）35、58が例示される。エマルゲン系界面活性剤としてはEmulgen 911、913等が例示される。トゥイーン系界面活性剤としてはトゥイーン（Tween）20、40、60、80、85が例示される。非イオン性界面活性剤としては、トリトン系及びトゥイーン系界面活性剤が最も好みしい。

## 【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0033

【補正方法】変更

【補正内容】

【0033】陰イオン界面活性剤としては、ドデシル硫酸塩等のアルキル硫酸塩、アルキルベンジル硫酸塩等が挙げられる。ドデシル硫酸塩としては、具体的にはドデシル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸カリウム、ドデシル硫酸カルシウム等を例示できる。上デシル硫酸ナトリウムが最も好みしい。アルカリ土類金属ハロゲン化物としては、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、塩化ストロンチウム等が挙げられる。塩化カルシウムが最も好みしい。

## 【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0036

【補正方法】変更

【補正内容】

【0036】ここで、アルカリ金属ハロゲン化物としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化リチウム等が

例示される。このうち、塩化ナトリウム、塩化カリウムが最も好ましい。このアルカリ金属ハロゲン化物は、 $\beta$ -グルカンの血液成分への吸着抑制作用を有するものと考えられる。本発明の $\beta$ -グルカン測定用前処理剤Aにおけるヘキサジメトリン化合物およびアルカリ金属水酸化物の配合割合は、前記兼用前処理剤とほぼ同じ範囲で調整でき、アルカリ金属ハロゲン化物は、前処理剤中に0.05~0.5モル/lの範囲で使用される。

## 【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書  
【補正対象項目名】0037  
【補正方法】変更  
【補正内容】

【0037】また、本発明の $\beta$ -グルカン測定用前処理剤Aは、組成成分として、さらに所望の成分を追加することができ、例えば、前記したアミノまたはイミノ化合物、ビシン等を前記兼用前処理剤と同じ程度の範囲で使用することもできる。また、本発明は、前記アルカリ金属水酸化物を主成分とする $\beta$ -グルカン測定用前処理剤Bをも提供する。この前処理剤Bには必要に応じて他の添加物が添加されていてもよい。このような添加物としては、例えば、 $\beta$ -グルカンが血液成分に吸着されてG因子系カスケード反応を抑制するのを防いだり、反応系を安定化したり、再現性を高める作用を有する物質が挙げられる。例えば、アルカリ金属ハロゲン化物等が好適に例示される。本発明の前処理剤は複数の溶液として保存し、使用時に該溶液を混合してもよい。アルカリ金属水酸化物とアルカリ土類金属ハロゲン化物及び/または非イオン性界面活性剤とは混合して長時間保存すると、沈殿を生じる等の不都合があるので、別々に保存し、前処理直前または前処理時に混合することが好ましい。特に、KOHとCaCl<sub>2</sub>及びTriton X-100とは別々に保存することが好ましい。

## 【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書  
【補正対象項目名】0039  
【補正方法】変更  
【補正内容】

【0039】リムルス反応を利用して試料中のリムルス試薬に特異的に反応する物質、即ち、エンドトキシンまたは $\beta$ -グルカンを測定する方法は、本発明の前処理剤で処理された試料をカブトガニ・アメボサイト・ライセートから得られたリムルス試薬と混合して反応させ、基質の変化を検出することにより行うことができる。前処理された試料は、遠心分離や中和処理をすることなく、直接リムルス反応に付すことができる。リムルス反応を利用する測定法は、リムルス試薬を前処理した試料に加え、混合液を約37°C、pH 7~9で適当な時間反応させ、基質の変化を基質に応じた反応測定手段によって測定し、予め標準試薬を用いて作成した検量線から $\beta$ -グ

ルカンまたはエンドトキシンの試料中の含有量を算出することによって行われる。この場合、エンドトキシンを測定する場合は、前記兼用前処理剤またはエンドトキシン測定用前処理剤で処理した試料を、少なくともエンドトキシンと反応するC因子系成分を含有したリムルス試薬と混合、反応させることができあり、好ましくは該リムルス試薬としてエンドトキシンのみと特異的に反応するものを選択することが極めて好ましい。このようなリムルス試薬としては、C因子系成分を含有し、G因子系成分は、除去もしくは阻害されたものが挙げられる。

## 【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書  
【補正対象項目名】0041  
【補正方法】変更  
【補正内容】

【0041】従って、エンドトキシンまたは $\beta$ -グルカンを測定する際の反応混合液は、G因子系またはC因子系の至適pH付近に調整されることが好ましく、通常pH 7~9になるように従来公知の緩衝液により所望に調整される。なお、本発明の前処理で失活した偽陽性因子、偽陰性因子は、後述の実験例等から活性が再生することはないと示明している。また、逆に、該前処理剤で処理された比較的高濃度の塩基性物質を含む被検液とリムルス試薬との混合において、該前処理剤が該G因子系またはC因子系中の各成分の反応性に悪影響を与えることがないものと該緩衝作用によるものであると考えられる。

## 【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書  
【補正対象項目名】0063  
【補正方法】変更  
【補正内容】

【0063】実施例1~3: 血清への $\beta$ -グルカン添加回収試験(処理時間)  
抗凝固剤を入れないで採血した健常人の血液3mlを4°Cに1時間静置した後、1,000×g、10分間遠心分離して血清を得た。この血清試料1.90μlを1.0pgの実施例1-1と同じ $\beta$ -グルカン調製品(ハイマシン)を含有する水溶液1.0μlを添加した後、その5μlをトキシベットプレート96Fにとり、0.1モル/lのKOH水溶液(前処理剤)2.0μlを加え、37°Cにおいて所定の時間加温保持し、これを被検液とした。

## 【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書  
【補正対象項目名】0064  
【補正方法】変更  
【補正内容】

【0064】そして、上記被検液に添加された $\beta$ -グルカンを実施例1-1の場合と同様の手段により測定した。各加温時間についての測定結果を実施例1-1の場

合と同様に表3として示す。

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0073

【補正方法】変更

【補正内容】

【0073】従って、真菌感染症患者のPRPを本発明の前処理剤で処理した後に $\beta$ -グルカンを測定することによって、真菌感染症、とりわけ通常の検査法では診断がきわめて困難な深在性真菌感染症の診断を迅速かつ正確に行なうことができた。

実施例1-6：真菌感染症患者血清検体の測定

真菌感染症の罹患が疑われる患者から実施例1-3と同様の方法で採血し、血清検体を調製した。その $5\mu\text{l}$ をトキシベットプレート96Fの各ウェルにとり、さらに0.1モル/1 KOH水溶液〔前処理剤〕 $20\mu\text{l}$ を加え、37°Cで10分間加温保持し、被検液とした。以後実施例1-1と同様の手段によりGテストと反応させ、吸光度を測定した。実施例1-4と同じ既知量のカーデランを標準試薬として用い、別に作成したの検量線により上記被検液中の $\beta$ -グルカン含量を換算した結果を表6に示す。

【手続補正15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0085

【補正方法】変更

【補正内容】

【0085】実施例2-3：エンドトキシン測定用発色合成分質法キット

下記の構成試薬からなる、エンドトキシン測定用発色合成分質法キット(100検体用)を作成した。

(A) 前処理剤 2.0ml

A液: 0.2モル/1 KOH、0.2%ボリブレン

B液: 0.2%トリトンX-100、0.14%エチレ

ンイミンポリマー、0.02モル/1 CaCl<sub>2</sub>、0.06モル/1 ビシン

使用直前にA液とB液を混合する。

(B) C因子系反応試薬(凍結乾燥品) 適量

タキブレウス・トリデンタツス由来のライセートからObayashi, T. et al. の方法(前出)に従って調製したC因子系成分と発色合成分質(Boc-Leu-Gly-Arg-g-pNA)を含む凍結乾燥品

(C) C因子系反応試薬溶解・反応用緩衝液 5.0ml  
0.2モル/1 トリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)

(D) 標準エンドトキシン試薬(凍結乾燥品) 適量  
大腸菌O111:B4株由来のエンドトキシン調製製品

(E) 標準エンドトキシン試薬溶解用蒸留水(エンドトキシン・フリー) 2.0ml

(F) ブランクテスト用蒸留水(エンドトキシン・フリー) 2.0ml

(G) 0.1モル/1 トリス-塩酸緩衝液調製用蒸留水(エンドトキシン・フリー) 5.0ml

実施例3-1：PRPへの $\beta$ -グルカン添加回収試験(前処理剤のボリブレン濃度)

実施例2-1と同様の手段により調製したPRP試料190 $\mu\text{l}$ にブクリョウ菌(Poria cocos)由来の $\beta$ -グルカン調製品(バキマン)の水溶液(4ng/ml)10 $\mu\text{l}$ を加え、よく混合した後、その5 $\mu\text{l}$ を $\beta$ -グルカン・フリーのマイクロプレート(トキシベットプレート96F、生化学工業(株)販売、商品名)に取り、前処理剤として0.1モル/1 KOHおよび0.3モル/1 塩化カリウム(KCl)を含有する水溶液に0.01~0.5% (重量/容量)になるようにボリブレンを添加した水溶液の混液(20 $\mu\text{l}$ )を加え、強制エア-循環式マイクロプレートリーダー(ウェルリーダーSK601、生化学工業(株)販売、商品名)内で37°C、10分間保持した。